

## I. СИМБИОГЕНЕТИКА И ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ

### МИКРОБЫ И РАСТЕНИЯ: МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИАЛОГ В РИЗОСФЕРЕ

И. А. Тихонович

*ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, С.-Петербург*

**Microbes and plants — molecular dialog in rhizosphere**

*I. A. Tikhonovich*

*All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology*

The symbiotic interaction between legumes and nodule bacteria is a complex signal exchange process leading to the mutual recognition by partners and to initiation of the morpho-physiological changes in both organisms resulting in the formation of nitrogen-fixing nodule. Up to now, two major stages were characterized in the molecular dialog between symbionts. During the first stage, flavonoids secreted by the plant roots, via interaction with the product of bacterial regulatory gene *nodD*, induce the coordinated expression of rhizobial *nod* genes. Enzymes encoded by the *nod* genes are involved in the second stage of the dialog — production and secretion by rhizobia of nodulation factors, e.g. Nod factors, — bacterial regulatory molecules. Nod factors are chitin oligomers decorated by different chemical groups. Nod factors have biological activity on plants — they are able to induce cell divisions in root cortex leading to formation of nodule meristem. Nod factor structure and, to less extent, flavonoid contents in plants are the major determinants of the host specificity of the symbiosis. In this review we discuss the peculiarities of the regulation of the *nod* gene expression, the role of Nod factor structural diversity for the host specificity of symbiosis, effects caused by Nod factors in plants and mechanisms of their action. The approaches for optimization of the signal exchange in order to increase the effectiveness of legume-rhizobial symbiosis are discussed.

Способность к симбиотическим взаимодействиям с микроорганизмами — одно из ключевых биологических свойств высших растений. Благодаря этим взаимодействиям растения могут обеспечивать свое минеральное питание (за счет симбиотических азотфиксаторов или же микоризных грибов) способствующих ассимиляции питательных веществ из почвы, защиту от растительноядных животных (симбиозы с эндофитными грибами и бактериями, продуцирующими токсины), фитопатогенов и стрессовых воздействий (многие эндосимбионты и ассоциативные симбионты). Изучение микробно-растительных взаимодействий показало, что растение следует рассматривать не как химическую машину, преобразующую минеральные вещества и энергию света в органику, а как компонент сложной симбиотической системы, который осуществляет свои ключевые функции за счет метаболического потенциала микросимбионтов.

Симбиозы, образуемые бобовыми растениями и клубеньковыми бактериями, наиболее изученные среди всех микробно-растительных симбиозов. Это обусловлено легкостью культивирования микросимбионтов *ex planta*, образованием у растений морфологически выраженных симбиотических органов — клубеньков, а также возможностью точного из-

мерения в лабораторных условиях биологического эффекта симбиоза (количество поглощенного из атмосферы азота, прибавка массы растений). К настоящему времени выяснилось, что образование бобово-ризобияльного симбиоза тесно связано со многими фундаментальными функциями растений — цитодифференцировкой и органогенезом, азотным и углеродным обменом, защитой от патогенов и регуляцией развития. Поэтому одним из важнейших стимулов для изучения симбиоза стала возможность его использования в качестве модели для разработки ряда фундаментальных и прикладных проблем биологии и генетики развития высших растений. Немаловажным стимулом для изучения бобово-ризобияльного симбиоза является и его большое практическое значение: целый ряд бобовых (соя, люцерна, горох, арахис) относится к числу ключевых сельскохозяйственных культур, выращивание которых на экологически чистом “биологическом” азоте — весьма актуальная задача.

Начальная стадия многих микробно-растительных взаимодействий — это взаимное узнавание партнеров, которое в значительной степени основано на обмене молекулярными сигналами [33, 60]. Идентификация микробами выделяемых растениями факторов, а также растительной клеточной поверхности инициирует физиологические процессы, необходимые для инфицирования хозяина. В свою очередь, воздействие микробных сигналов индуцирует экспрессию растительных генов, необходимых для активизации защитных или усиливающих взаимодействие ответных реакций растений. Наиболее изученными примерами таких процессов являются: развитие фитопатогенов с последующим образованием фитоалексинов и их элиситоров; активация *vir*-генов *Agrobacterium* spp. и возникновение корончатых галлов; начальные стадии образования бобово-ризобияльного симбиоза.

Симбиоз ризобий и бобовых растений основывается на сложных морфофизиологических изменениях клеток обоих партнеров. Последние исследования сигнальных взаимодействий, определяющих становление азотфиксирующего симбиоза, позволили идентифицировать первые растительные морфогены, индуцирующие развитие симбиотических органов — корневых клубеньков. Круг растений-хозяев, на которых индивидуальные штаммы ризобий формируют клубеньки, детерминирована бактериальными *nod*-генами, некоторые из которых кодируют белки, определяющие биосинтез сигнальных молекул (*Nod*-факторов). Комплементарность взаимодействия между штаммами ризобий и видами (сортами) бобовых в значительной степени определяется структурным разнообразием *Nod*-факторов, которое, в свою очередь, определяет специфичность взаимодействия бактерий с бобовыми растениями [16, 38, 87].

### Регуляция экспрессии ризобияльных *nod*-генов

Экспрессия ризобияльных *nod*-генов обычно определяется с помощью бактериальных штаммов, у которых проведено слияние промоторов этих генов с репортерным геном *lacZ* (структурный ген β-галактозидазы) из *Escherichia coli* [87]. При использовании такой генетической конструкции экспрессия изучаемого *nod*-гена может регистрироваться по возрастанию β-галактозидазной активности. На первом этапе микробно-растительного взаимодействия флавоноиды, выделяемые в почву семенами или корнями бобовых, взаимодействуют с бактериальным белком NodD, который в результате приобретает способность активировать транскрипцию общих (*nodABC*) и специфических *nod*-генов. Ген *nodD* является единственным конститутивно работающим геном вирулентности ризобий, тогда как экспрессия других *nod*-генов индуцибельна. При этом NodD-зависимая активация ризобияльных генов вирулентности — уже достаточно специфичная симбиотическая реакция.

Флавоны, флаваноны и изофлавоны, роль которых существенна в инициации бобово-ризобияльного симбиоза, представляют собой группу фенольных производных, широко распространенных в растениях. Основу их структуры составляют соединения, образующиеся в результате конденсации производных коричной кислоты и малонатных структур. Флавоноиды, находящиеся в корнях, обладают широким спектром действия: они участвуют в защите от фитопатогенов, регуляции роста и инфицирования корня, влияют на различные стадии азотного метаболизма корня и обуславливают аллелопатические эффекты [12, 68].

Первым химически охарактеризованным индуктором экспрессии *nodABC*-генов стал лютеолин, выделенный из экстракта семян люцерны [65]. К настоящему времени имеются данные о качественном и количественном составе флавоноидных метаболитов, выделяемых рядом бобовых растений, а также о степени их *nod*-индуцирующей активности. Наиболее изучены в этом отношении флавоноиды люцерны. Уже при набухании семян люцерны в первые четыре часа кроме лютеолина выделяется еще ряд флавоноидов — производных лютеолина и апигенина, общим количеством 8,0 нмоль/семя/сут., причем наиболее активные из них — хризоеириол и лютеолин [34]. В корневых экзометаболитах люцерны, которые по своему флавоноидному составу отличаются от экссудатов семян, основными *nod*-индукторами являются 4,4'-диокси-2'-метоксихалкон, 4,7-диоксифлавоон и 4,7-диоксифлавонон, выделяющиеся в количестве около 0,1 нмоль/растение/сут. Лютеолин и хризоеириол в корневых экссудатах люцерны не были обнаружены, а 4,4'-диокси-2'-метоксихалкон индуцировал транскрипцию *nod*-генов *S. meliloti* в концентрации на порядок меньшей, чем лютеолин. Индуцирующая активность фракции флавоноидов корневых экзометаболитов была на два порядка меньше суммарной активности метаболитов, выделившихся из набухающих семян. Среди флавоноидных индукторов, выделенных из экссудатов семян и корневых проростков люцерны, наиболее активен 4,4'-диокси-2'-метоксихалкон, вызывающий 50%-ную индукцию *nodABC-lacZ* слияния у *S. meliloti* в концентрации 2 нмоль. Для хризоеириола и лютеолина эти величины составляли 5 и 18 нмоль соответственно [34].

То, что семена и корни выделяют несколько флавоноидов, позволяет предположить, что клубенькообразование у бобовых — результат сложных взаимодействий белка NodD с растительными сигналами, одни из которых служат стимуляторами, а другие ингибиторами *nod*-генов. Так, индуцирующая активность смеси эквимоларных количеств лютеолина (сильный индуктор) и апигенина (слабый индуктор) была в два раза ниже активности одного лютеолина. Наряду с этим лютеолин и халкон в низких концентрациях вызвали синергическое увеличение транскрипции *nod*-генов, что, вероятно, и объясняет неоднократно отмечаемое повышенное количество клубеньков в верхней части первичного корня — в зоне экссудации при прорастании семян, где могут находиться одновременно и лютеолин, выделяемый семенами, и халкон, выделяемый корнями [34, 35].

Для каждого вида ризобий характерны свои флавоноидные стимуляторы и ингибиторы *nod*-генов. Так, *nod*-гены *R. leguminosarum* bv. *trifolii* стимулируются тремя флавоноидами, а ингибируются четырьмя. Клубеньковые бактерии фасоли (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*) активно индуцируются эриодиктиолом, нарингенином и генистеин-7-глюкозидом из экссудатов растений. Хотя корневые флавоноиды составляют всего лишь 6% от количества флавоноидов, выделяемых семенами, в среднем индивидуальные вещества, секретируемые из корней, являются в три раза более активными, чем *nod*-индукторы из семян [40]. Количество флавоноидов, выделяемых фасолью, существенно влияет на последующее клубенькообразование. Линии, выделяющие большее количество флавоноидов после инокуляции, образуют и большее количество клубеньков, а наиболее богатые флавоноидами

линии фасоли, которые образуют окрашенные семена, превосходят белосемянные линии по количеству образуемых клубеньков [41, 42].

Индукторами *nod*-генов клубеньковых бактерий сои являются изофлавоны дайдзеин и генистеин [49, 76]. Недавно был охарактеризован еще один сильный индуктор из корневых экссудатов сои — изолнквиртигенин, который, помимо индукции *nod*-генов, способствовал повышению устойчивости бактерий сои к флавоноидному фитоалексину глицеоллину [45]. Вероятно, что изофлавоны сои, как и флавоноиды фасоли, определяют генотипические различия по клубенькообразованию. Показано, что супернодулирующие (*Nod*++) мутанты сои выделяли после инокуляции большее количество флавоноидов, чем исходные формы [62].

Индукторы из экстрактов семян или экссудатов корней одного растения-хозяина не обязательно идентичны индукторам другого хозяина из той же группы перекрестной инокуляции (группы видов бобовых, инокулируемых сходными бактериями). Так, экссудаты *Vicia sativa*, *V. hirsuta* и *Pisum sativum* содержат различные индукторы *nod*-генов *R. leguminosarum* bv. *viciae*. В каждом из экссудатов присутствует более одного индуктора, предпочтительно активирующего определенный *nodD*-ген. Например, в экссудатах *V. sativa* обнаружено не менее семи индукторов, шесть из которых — флавоны [93]. Более того, некоторые индукторы из корневых экссудатов вики и гороха способны индуцировать *nodD*-гены неспецифического микросимбионта — ризобий люцерны, хотя и не до максимального уровня, т. е. специфичность симбиоза в этом случае определяется на более поздних стадиях развития [92].

Для группы перекрестной инокуляции клевера наблюдается аналогичная ситуация. Мажорные индукторы *nodD*-гена *R. leguminosarum* bv. *trifolii* из экссудатов *Trifolium repens* и *T. subterraneum* различались по хроматографической подвижности (Rf), причем экссудаты *T. repens* способны вызывать, по крайней мере, 50%-ную индукцию *nodD*-генов *R. leguminosarum* bv. *viciae* и *S. meliloti* [82].

Ряд флавоноидов, не обладающих заметной *nod* индуцирующей активностью, могут ингибировать вызванную эффективными индукторами транскрипцию бактериальных *nod*-генов. Так, для *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *S. meliloti* индукция 4',7-диоксифлавоном ингибируется формонетинном [17]. Изофлавоноиды дайдзеин и генистеин, эффективные индукторы для *B. japonicum* [49], а также флавонол кемпферол — индуктор *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* [58] подавляют индукцию *nod*-генов *R. leguminosarum* bv. *viciae* [25]. В свою очередь нарингенин (индуктор *nod*-генов у *R. leguminosarum* bv. *viciae*) и хризин репрессируют вызванную дайдзеином и генистеином транскрипцию *nod*-генов у *B. japonicum* [50]. Наиболее активные ингибиторы транскрипции *nod*-генов у *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *S. meliloti* [66] также являются структурными аналогами природных индукторов в этих симбиотических системах. Следует отметить, что для ингибирования *nod*-генов требуется концентрация флавоноида, на 1–2 порядка превышающая концентрацию, необходимую для индукции. Ингибирование активности *nod*-генов носит штаммоспецифический характер [50]. Так, хризин и нарингенин, активные ингибиторы транскрипции, вызванной дайдзеином у ряда типовых штаммов *B. japonicum*, не влияли на индукцию *nod*-генов *B. japonicum* USDA110 даже в концентрации 50 мкмоль. Как показали опыты с мечеными ингибиторами, это объясняется высокой скоростью деградации хризина и нарингенина штаммом USDA110.

Приведенные данные позволили предположить, что ингибиторы транскрипции конкурируют с индукторами, взаимодействуя с продуктом гена *nodD*. Возможно, что существование двух типов соединений — стимуляторов и ингибиторов — необходимо для взаимодействия бактерий с теми клетками корня, которые способны к восприятию и передаче



симбиотических сигналов. Эти клетки обычно располагаются в зоне появления корневых волосков, следующей за зоной делящихся клеток. Делящиеся клетки с тонкими стенками, возможно, выделяют большие количества ингибиторов для защиты от ризобий, способных их деградировать [17, 18].

Большой интерес представляют данные [83] о создании гибридного гена *nodD*, состоящего на 75% из гена *nodD1* *S. meliloti* и на 25% из гена *nodD* *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (*nodD604*). Этот ген оказался способным конститутивно (в отсутствии флавоноидов) активировать максимальную транскрипцию генов клубенькообразования у клубеньковых бактерий гороха, клевера и люцерны. Более того, эта активация оказалась нечувствительной ко всем известным ингибиторам *nod*-генов. Бактерии, содержащие ген *nodD604*, были способны формировать азотфиксирующие клубеньки не только на гомологичных, но и на гетерологичных растениях-хозяевах, в том числе на ряде тропических бобовых, на которых исходные штаммы *R. leguminosarum* bv. *trifolii* и *S. meliloti* были неvirulentны. Так как количество флавоноидных индукторов в ризосфере ограничено [47], штаммы с подобными гибридными *nodD*-генами могут быть использованы для повышения симбиотической азотфиксации в полевых условиях, а также, с применением ингибиторов индукции, для подавления высоко конкурентных, но малоэффективных местных штаммов [58, 59]. Перенос *nodD*-генов из одного ризобияльного штамма в другой вызывает в некоторых случаях расширение диапазона хозяйской специфичности [39].

Одним из механизмов, определяющих хозяйскую специфичность клубенькообразования, может быть наличие у ризобий нескольких копий гена *nodD*. Так, у ризобий люцерны из *Sym*-плазмиде выявлено три функционально активные копии этого гена (*nodD1*–*nodD3*), которые реагируют с флавоноидными индукторами от разных растений-хозяев [31], а у ризобий сои имеется две копии этого гена [30]. В то же время у штамма NGR234 *Rhizobium* sp., обладающего очень широким кругом растений-хозяев, имеется единственная копия гена *nodD*, которая обеспечивает активацию генов virulentности разными флавоноидами-эффекторами [70].

В растительных тканях ризобияльные *nod*-гены индуцируют целый ряд процессов, включающих сильную экспрессию ряда растительных генов в инфекционных нитях и ранней инфекционной зоне внутри клубенька [87]. Однако экспрессия *nod*-генов останавливается или значительно уменьшается при выходе бактерий из инфекционных нитей и образовании бактерондов [78]. У *R. leguminosarum* bv. *viciae* уровень содержания белков NodA, NodI, NodE и NodO в клубеньках по крайней мере в 14 раз ниже, чем в бактериальной культуре, в то время как количество белка NodD уменьшается только в три раза [79]. В случае транскрипции *nodD*-генов *S. meliloti* в клубеньках люцерны ситуация совершенно иная — экспрессия *nodD1* и *nodD3* в зрелых клубеньках многократно уменьшается [78]. Низкий уровень транскрипции *nod*-генов возможен вследствие: а) лимитирования количества NodD-белков, б) отсутствия индукторов, в) появления специфических репрессоров экспрессии *nod*-генов [80]. Идентифицирован репрессор *nod*-генов у *S. meliloti*, существуют также доказательства того, что экспрессия *nod*-генов у этих бактерий подавляется  $\text{NH}_4^+$  [22]. Однако было показано, что концентрация азота существенно не влияет на экспрессию *nod*-генов у *R. leguminosarum* bv. *viciae* [5].

По крайней мере у некоторых ризобияльных штаммов существует регуляторная система, дополнительная к контролю белком NodD индукции экспрессии *nod*-генов. Так, у *B. japonicum* в этом процессе участвуют продукты генов *nodV* и *nodW*, которые являются составными частями двухкомпонентной регуляторной белковой системы. Они определяют широкую хозяйскую специфичность *B. japonicum* и, по-видимому, необходимы для нормальной высокоуровневой индукции *nod*-генов [77].

## Роль структурного разнообразия Nod-факторов в специфичности образования симбиоза

Индукция растительными флавоноидами бактериальных *nod*-генов является лишь первым этапом развития симбиоза, на котором проявляется специфичность взаимодействия партнеров. Окончательно эта специфичность определяется при воздействии на бобовые Nod-факторов, синтезируемых бактериями в ответ на действие флавоноидов. Nod-фактор, структура которого была установлена первой, был выделен из культуральной жидкости *S. meliloti* при добавлении индуктора лютеолина [53]. Позднее было показано, что *S. meliloti* продуцирует целый набор структурно сходных липоолигосахаридов. Длина олигосахаридной цепи варьировала от трех до пяти мономеров ацетилглюкозамина [6, 73, 81]. Как и *S. meliloti*, все исследуемые впоследствии виды ризобий выделяли по несколько типов Nod-факторов. Все они липохитоолигосахариды, однако их структурные особенности характерны для каждого вида ризобий и даже для индивидуальных штаммов. Роль бактериальных *nod*-генов в контроле структуры Nod-факторов была окончательно установлена после того, как были выделены и идентифицированы продукты этих генов. Сборка коровой структуры фактора, лишенной заместителей, кодируется общими *nodABC*-генами. Предшественник синтеза скелета фактора — глюкозамин-6-фосфат образуется с помощью глюкозаминсинтазы, кодируемой геном *nodM* [5]. Синтез хитинового скелета контролирует белок NodC, гомологичный хитинсинтазе [15, 29, 46]. Продукт гена *NodB* деацетирует терминальный редуцирующий ацетилглюкозамин [44], а белок NodA присоединяет жирную кислоту к этому глюкозамину [72, 75].

Гены хозяйской специфичности модифицируют коровую структуру Nod-фактора. Так, контролируемая геном *nodH* сульфатная группа, прикрепленная к восстанавливающему концу олигосахаридной цепочки, — основной детерминант хозяйской специфичности у *S. meliloti* [53, 74]. Указанная сульфатная группа необходима для индукции ответной реакции у растений люцерны и одновременно препятствует возникновению ответа у растений, не являющихся хозяевами, например у вики [90].

У *R. leguminosarum* и *R. meliloti* роль важнейшего гена хозяйской специфичности играет *nodE* [53, 84]. Продукты генов *nodE* и *nodF*, гомологичные кетоацилсинтазе и ацилпереносящему белку, необходимы для синтеза высоко ненасыщенной ацильной цепи на редуцирующем конце [84]. Гидрофобность этой жирной кислоты определяет различия в хозяйской специфичности внутри вида *R. leguminosarum* — между *R. leguminosarum* bv. *viceae* и *trifolii* [8, 85]. NodL-белок гомологичен ацетилтрансферазе и добавляет О-ацетильную группу к Nod-фактору [7, 84]. Ген *nodS* отвечает за N-метилирование Nod-фактора на редуцирующем конце [28, 43]. Ген хозяйской специфичности *nodZ* из *Bradyrhizobium japonicum* необходим для заражения тропического бобового сиратро (*Macroptilium* Urb.). Он отвечает за добавление к редуцирующему концу N-глюкозамина остатка 2-О-метилфукозы [57, 88]. Однако Nod-факторы бактерий, способных к перекрестному заражению различных видов бобовых растений, включая *Macroptilium*, содержат либо N-метильный заместитель (*R. tropici*), либо дополнительный моносахаридный остаток (*S. fredii*) [6, 57, 67]. Таким образом, специфичность инокуляции таких растений-хозяев, как *Macroptilium*, не всегда связана с существованием особого заместителя на олигосахаридной цепочке Nod-фактора. По-видимому, такие штаммоспецифичные заместители, как N-метильный или фукозилный остатки, в ряде случаев могут выполнять эквивалентную роль в трансдукции бактериального сигнала [87].

Описанные выше гены принимают участие в синтезе коровой структуры и декорировании Nod-факторов ризобий. Имеется еще ряд генов, влияющих на клубенькообразование и хозяйскую специфичность, функции которых связаны с дальнейшей судьбой синтезируемых сигналов и описаны пока очень неполно. Большинство секретируемых бактериальными Nod-метаболитов накапливается вначале в клетке [19]. Предполагается, что гены *nodI* и *nodJ* контролируют транспорт фактора через мембрану [86].

## Действие Nod-факторов на бобовые растения

Выделенные из бактериальных культур или химически синтезированные Nod-факторы в диапазоне концентраций  $10^{-8}$ – $10^{-12}$  М могут инициировать различные процессы в растениях. Первыми биохимическими реакциями являются деполяризация клеточной мембраны корневого волоска [23, 25, 52], модуляция протонных и кальциевых ионных потоков в растительной клетке [3]. Эти реакции сопровождаются деформацией корневых волосков, являющейся первым морфологическим различимым этапом инфекции корней бобовых клубеньковыми бактериями. Однако еще более ранняя реакция растения на наномолярные концентрации ризобияльных Nod-факторов — мембранная деполяризация клеток корня происходит уже через 10 мин после инокуляции [23]. У *Vicia sativa* уже пяти-десяти минут воздействия Nod-факторов на корни достаточно для индукции деформации корневых волосков, которая проявляется через час. [36]. Через три часа в соответствующих восприимчивых зонах может деформироваться большинство корневых волосков. Эти процессы, по-видимому, не являются строго хозяйско-специфичными в развитии симбиоза. Так, деформация корневых волосков у *Vicia sativa* может индуцироваться Nod-факторами, выделенными из культуральной жидкости не только *R. leguminosarum* bv. *viciae*, но также и из *B. japonicum* [10] или из *R. loti* [56]. Эти Nod-факторы могут индуцировать скручивание корневых волосков у *Macroptilium* [70, 71]. Их индукция также не является хозяйско-специфичной, хотя использование в  $10$ – $100$  раз больших концентраций Nod-факторов из неспецифичных групп ризобий позволяет достигнуть такой же степени скручивания, как при действии Nod-факторов специфичного штамма.

Большой интерес представляет вопрос о происхождении сигнальных взаимодействий ризобий с бобовыми и о связи этих взаимодействий с другими морфогенетическими процессами у растений. С одной стороны, было показано, что Nod-факторы близки по структуре к олигосахаридам, которые играют важную роль в регуляции развития высших растений [13]. Поэтому логичным было бы предположить, что в процессе коэволюции с растениями-хозяевами ризобии “научились” имитировать синтез растительных регуляторов, возможно, в результате переноса некоторых генов от растений-хозяев. О возможности такого переноса говорят данные о том, что некоторые гены ризобий имеют структуру, очень близкую к генам эукариот, например ген глутаминсинтетазы-2 у *B. japonicum* [9], ген аденлатциклазы у *S. meliloti* [4] или белков цитоскелета у *S. meliloti* [61]. С другой стороны, Nod-факторы по структуре близки к олигомерам хитина, основного компонента клеточной стенки грибов. Поэтому представляется возможным и то, что система сигнального взаимодействия ризобий с бобовыми сформировалась в значительной степени на основе систем узнавания растениями более древних грибных симбионтов, например эндомикоризных грибов. Об этом свидетельствует наличие морфологически сходных стадий развития этих симбиозов и даже ряда общих генов, контролирующих их развитие [27].

В связи с этим важно отметить, что и клубеньковые бактерии и бобовые растения имеют сложные системы рецепции и процессинга сигнальных молекул, получаемых от

партнера. У ризобий это белок NodD и системы модификации (расщепления) растительных флавоноидов [69], а у бобовых — системы расщепления Nod-факторов хитиназами [88]. Однако природа растительных молекул, которые осуществляют рецепцию Nod-факторов, до сих пор не выяснена, и даже неясно, поверхностные или внутриклеточные эти рецепторы [48]. По-видимому, выявление растительных генов, контролирующих рецепцию Nod-факторов, а также анализ сигнальных взаимодействий с ризобиями на более поздних стадиях формирования эндосимбиотической системы, станет одной из основных задач молекулярно-генетического анализа симбиоза на ближайшие годы.

### **Оптимизация сигнальных взаимодействий как фактор повышения эффективности бобово-ризобияльного симбиоза**

Одним из наиболее изученных примеров сигнального взаимодействия ризобий с бобовыми является симбиоз “афганских” горохов генотипа *sym2sym2* [51, 55] со штаммами *R. leguminosarum* bv. *viciae*, содержащими ген вирулентности *nodX* [14]. Функция гена *nodX* известна [26]: он определяет присоединение ацетильного остатка в положении C-6 редуцирующего конца Nod-фактора, что, возможно, повышает устойчивость этого фактора к действию растительных хитиназ или скорость его проникновения в корни гороха. Механизм действия комплементарной растительной аллели *sym2* пока еще неясен, однако возможно, что она связана со специфической рецепцией Nod-фактора или же с его транспортом внутри растительных клеток.

Важно отметить, что взаимодействие *sym2*–*nodX* весьма специфично, так как большинство штаммов ризобий гороха, обитающих в почвах Европы, лишено гена *nodX* и, следовательно, не может инокулировать “афганские” горохи. Зато европейские штаммы *R. leguminosarum* bv. *viciae* легко вступают в симбиоз с культурными формами гороха, имеющими генотип *Sym2Sym2*. Это часто затрудняет использование препаратов ризобий под горох: высокоактивные производственные штаммы оказываются неспособными конкурировать с находящимися в почвах “местными” малоактивными, но конкурентоспособными штаммами ризобий. Очевидно, что преодолеть эту конкуренцию можно, введя в генотип культурных горохов рецессивную аллель *sym2*, а в генотип производственных штаммов ризобий — комплементарный ген *nodX*. Наиболее изученный носитель гена *nodX* — штамм ТОМ, выделенный из почв Турции [91]. Однако его практическое использование затруднено так называемым эффектом Cnb (competitive nodulation blocking) — блокированием образования клубеньков на “афганском” горохе в присутствии неvirulentных штаммов ризобий [20, 91]. К счастью, Cnb-эффект не обязательный результат наличия у бактерий гена *nodX*: нам удалось выделить из почв Северо-Запада России штамм А1, который способен активно заражать “афганские” горохи в присутствии других местных штаммов [1]. Этот штамм, как и ТОМ, содержит ген *nodX*, причем гомология этого гена при сравнении штаммов ТОМ и А1 оказалась близкой к 100%.

Для создания растительного компонента системы, комплементарного штамму А1, была использована разработанная Н. М. Чекалиным [2] методика введения гена *sym2* из “афганских” горохов в культурные сорта. В результате совместной работы с ВНИИ зернобобовых и крупяных культур (г. Орел) был получен ряд изолиний высокопродуктивного сорта Норд, которые сохранили весь комплекс хозяйственноценных признаков этого сорта, однако при этом гомозиготны по аллели *sym2* и поэтому практически не образуют клубеньков при выращивании в стандартных почвах [63]. В полевых условиях при инокуляции



А1 урожайность семян у отселектированных линий была на 57% выше, чем у исходного сорта Норд, а также существенно возросло содержание фиксированного азота в урожае, т. е. наблюдалось ожидаемое комплементарное взаимодействие растительного и бактериального генотипов.

Весьма неожиданные результаты дало дальнейшее изучение сигнального взаимодействия в системе "афганских" горохов. В ходе работы, проведенной совместно с Лейденским университетом (группой, руководимой проф. Б. Люгтенбергом), мы выяснили, что устойчивость этих горохов к инфицированию может быть преодолена в результате введения в ризобияльный штамм не только гена *nodX*, но и негомологичного ему гена *nodZ*, который был первоначально выделен из штамма NGR234, способного заражать широкий круг тропических бобовых растений [64]. Ген *nodZ* определяет присоединение в положении С-6 редуцирующего конца Nod-фактора остатка фукозы, который по молекулярной конфигурации и массе значительно отличается от ацетильного остатка. Таким образом, существенным для преодоления устойчивости "афганских" горохов оказалась достаточно неспецифическая модификация редуцирующего конца Nod-фактора, что весьма существенно для дальнейших работ по конструированию штаммов ризобий, способных к эффективному симбиозу с сортами гороха, имеющими генотип *sym2sym2* [64].

Таким образом, обмен партнеров сигнальными факторами является универсальной стратегией формирования микробно-растительных симбиотических систем. Сигналлинг следует рассматривать как основной способ: а) перехода организма из свободноживущего в симбиотическое состояние; б) взаимной регуляции жизнедеятельности партнеров при симбиозе. Результатом сигналлинга является высокоспецифичная перекрестная регуляция генов партнеров, что принципиально отличает сигнальные взаимодействия от трофических, сводящихся к обмену партнеров источниками питания или энергии. Однако именно сигнальные взаимодействия, происходящие на самых первых стадиях узнавания партнеров, определяют возможность дальнейшего развития симбиоза, что приводит к формированию у растений сложно устроенных клубеньков, к индукции симбиотической азотфиксации и в конечном итоге придает растениям принципиально новую трофическую функцию — использование  $N_2$  в качестве основного источника азотного питания.

## УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Четкова С. А., Тихонович И. А. Выделение и исследование штаммов *Rhizobium leguminosarum*, эффективных на горохах афганского происхождения // Микробиология. 1986. Т. 55, вып. 1. С. 143–147.
2. Чекалин Н. М. Направления селекции зерновых бобовых культур на повышение эффективности симбиотической азотфиксации // Биологический азот в сельском хозяйстве СССР. М., 1989. С. 199–205.
3. Allen N. S., Bennet M. N., Cox D. N. Effects of Nod factors on alfalfa root hair  $Ca^{++}$ , and  $H^+$  currents and on cytoskeletal behavior // Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Dordrecht, 1994. P. 107–114.
4. Archdeacon J., Talty J., Boetsen B., Danchin A., O'Gara F. Cloning of the second adenylate cyclase gene (*nodZ*) from *Rhizobium meliloti* F34: sequence similarity to eukaryotic cyclases // FEMS Microbiol. Lett. 1995. Vol. 128. P. 177–184.
5. Baev N., Endre G., Petrivic G., Banfalvi Z., Kondorosi A. Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase // Mol. Genet. 1992. Vol. 228. P. 113–124.
6. Bec-Ferte M. P., Krishnan H. B., Prome D. Structures of nodulation factors from the nitrogen-fixing soybean symbiont *Rhizobium fredii* USDA257 // Biochemistry. 1994. Vol. 33. P. 11782–11788.
7. Bloemberg G. V., Thomas-Oates J. E., Lugtenberg B. J. J., Spaank H. P. Nodulation protein NodL of *Rhizobium leguminosarum* O-acetylates lipo-oligosaccharides, chitin fragments and N-acetylglucosamine *in vitro* // Mol. Microbiol. 1994. Vol. 11, № 4. P. 793–804.

8. Bloemberg G. V., Kamst E., Harteveld M., van der Drift K. M. G. M., Haverkamp J., Thomas-Oates J. E., Lugtenberg B. J. J., Spaik H. P. A central domain of *Rhizobium* NodE protein mediates host specificity by determining the hydrophobicity of fatty acyl moieties of nodulation factors // *Mol. Microbiol.* 1995. Vol. 16, № 6. P. 1123–1136.
9. Carlson T.A., Cheltn B.K. Apparent eukaryotic origin of glutamine synthetase 2 from the bacterium *Bradyrhizobium japonicum* // *Nature*. 1986. Vol. 322. P. 568–570.
10. Carlson R. W., Sanjuan J., Bhat U. V., Glushka J., Spaik H. P., Wijffes A. H., van Brussel A., Stokkermans T., Peters N. K., Stacey G. The structures and biological activities of the lipooligosaccharide nodulation signals produced by type-I and type-II strains of *Bradyrhizobium japonicum* // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 8372–8381.
11. Dakora F. D., Joseph C. M., Phillips D. A. *Rhizobium meliloti* alters flavonoid composition of alfalfa root exudates. // *New Horizons in Nitrogen Fixation* // Eds Palacios R. et al. Dordrecht; Boston; Lancaster: Kluwer Acad. Publ. 1993. P. 335.
12. Dakora F.D., Joseph C.M., Phillips D.A. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti* // *Plant Physiol.* 1993. Vol. 101. P. 819–824.
13. Darvill A., Augur C., Bergmann C., Carlson R. W., Cheong J. J., Eberhard S., Hehn M. G., Lo V. M., Marfa V., Meyer B., Mohnen D., O'Neil M. A., Spiro M. D., Halbeek H., York W. S., Albersheim P. Oligosaccharins — oligosaccharides that regulate growth, development and defense responses in plants // *Glycobiology*. 1992. Vol. 2. P. 181–198.
14. Davis E.O., Evans I.J., Johnston A.M.B. Identification of *nodX*, a gene that allows *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain TOM to nodulate Afghanistan peas // *MGG*. 1988. Vol. 212. P. 531–535.
15. Debelle F., Rosenberg C., Denarie J. The *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, and *Azorhizobium* NodC proteins are homologous to yeast chitin synthases // *MPMI*. 1992. Vol. 5. P. 443–446.
16. Denarie J., Debelle F., Prome J.C. *Rhizobium* lipochitooligosaccharide nodulation factors: Signalling molecules mediating recognition and morphogenesis // *Ann. Rev. Biochem.* 1996. Vol. 65. P. 531–535.
17. Djordjevic M. A., Redmond W., Batley M., Rolfe G. B. Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress *nod* gene expression in *Rhizobium trifolii* // *EMBO J.* 1987. Vol. 6, № 5. P. 1173–1179.
18. Djordjevic M. A., Weinman J. J. Factors determining host recognition in the clover — *Rhizobium* symbiosis // *Aust. J. Plant Physiol.* 1991. Vol. 18. P. 543–557.
19. Djordjevic M. A., McKay I. A., De Boer M., Rolfe B. G. Nod metabolites excreted by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* also accumulate in the cell membrane // *New Horizons in Nitrogen Fixation*. Dordrecht etc, 1993. P. 226.
20. Dowling D. N., Stanley J., Broughton W. J. Competitive nodulation blocking of Afghanistan pea is determined by *nodABC* and *nodEF* alleles in *Rhizobium leguminosarum* // *MGG*. 1989. Vol. 216. P. 170–174.
21. Downie J. A., Davies A. E., Sutton J. M., Dean G., Ghelani S., Lea E. J. A., Wilson K. E., Firmin J. L. The roles of *nodX* and *nodO* in host specific nodulation of peas and vetch by *Rhizobium leguminosarum* // *Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference* / Eds Kiss G. and Endre G. Szeged: Officina Press. 1994. P. 54–58.
22. Dusha I., Kondorosi A. Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti* // *Mol. Gen. Genet.* 1993. Vol. 240. P. 435–444.
23. Ekrhardt D. W., Atkinson E. M., Long S. R. Depolarisation of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors // *Science*. 1992. Vol. 256. P. 998–1000.
24. Felle H. H., Kondorosi E., Kondorosi A., Schultze M. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differently sensitive to structural modifications of lipochitooligosaccharide // *Plant J.* 1995. Vol. 7. P. 939–947.
25. Firmin J. L., Wilson K. E., Rossen L., Johnston A. W. B. Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants // *Nature*. 1986. Vol. 324. P. 90–92.
26. Firmin J. L., Wilson K. E., Carlson R. W., Davies A. E., Downie J. A. Resistance to nodulation of cv. Afghanistan peas is overcome by *nodX* which mediates an O-acetylation of the *Rhizobium leguminosarum* lipo-oligosaccharide nodulation factor // *Mol. Microbiol.* 1993. Vol. 10, № 2. P. 351–360.
27. Gianinazzi-Pearson V., Dumas-Gaudot E., Gollote A., Tahiri-Alaoui A., Gianinazzi S. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi // *New Phytologist*. 1996. Vol. 133. P. 45–57.
28. Geelen D., Mergaert P., Geremia R. A., Goormachtig S., Van Montagu M., Holsters M. Identification of *nodSUIJ* genes in Nod locus 1 of *Azorhizobium caulinodans*: Evidence that *nodS* encodes a methyltransferase involved in Nod factor modification // *Mol. Microbiol.* 1993. Vol. 9. P. 145–154.
29. Geremia R. A., Mergaert P., Geelen D., van Montagu M., Holsters M. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminotransferase // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. Vol. 91. P. 2669–73.
30. Gottfert M., Weber J., Hennecke H. Induction of *nodA-lacZ* fusion in *Bradyrhizobium japonicum* by an isoflavone // *Plant Physiol.* 1988. Vol. 132. P. 394–397.
31. Gottfert M., Grob P., Hennecke H. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes determines of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. Vol. 87. P. 2680–2684.

32. Gyorgypal Z., Iyer N., Kondorosi A. Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti* // MGG. 1988. Vol. 212. P. 85–92.
33. Halverson L. J., Stacey G. Signal exchange in plant-microbe interactions // Microb. Rev. 1986. Vol. 50. P. 193–225.
34. Hartwig U. A., Maxwell C. A., Joseph C. M., Phillips D. A. Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce *nod* genes in *Rhizobium meliloti* // Plant Physiol. 1990. Vol. 92. P. 116–122.
35. Hartwig U. A., Phillips D. A. Release and modification of *nod*-gene — inducing flavonoids from alfalfa seeds // Plant Physiol. 1991. Vol. 95. P. 804–807.
36. Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaink H. P., van Kammen A., Bisseling T. Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa* // Plant Physiol. 1994. Vol. 105. P. 787–797.
37. Heidstra R., Kozik A., Geurts R., Bisseling T., van Kammen A. // Fine mapping of the *sym2* locus of pea linkage group 1 // A. Kozik. Preprint. 1996.
38. Hirsch A. M., Asad S., Fang Y., Wycoff K., Lobler M. Molecular interactions during nodule development // New Horizons in Nitrogen Fixation / Eds Palacios R. et al. Dordrecht: Boston; Lancaster: Kluwer Acad. Publ. 1993. P. 291–296.
39. Horvath B., Bachem C.W.B., Schell J., Kondorosi A. Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium meliloti* is mediated by a plant-signal, interacting with the *nodD* gene product // EMBO J. 1987. Vol. 6. P. 841–848.
40. Hungria M., Joseph C.M., Phillips D.A. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) // Plant Physiol. 1991. Vol. 97. P. 759–764.
41. Hungria M., Johnston A.W.B., Phillips D.A. Effect of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* // MPML. 1992. Vol. 5. № 3. P. 199–203.
42. Hungria M., Joseph C.M., Phillips D.A. Rhizobial growth, *nod*-gene inducing flavonoids and nodulation in black and white-seeded isogenic common bean *Phaseolus vulgaris* L. lines // New Horizons in Nitrogen Fixation / Eds Palacios R. et al. Dordrecht: Boston; Lancaster: Kluwer Acad. Publ. 1993. P. 348.
43. Jabbouri S., Fellay R., Talmont F., Kamalaprija P., Burger U., Relic B., Prome J.-C., Broughton W.J. Involvement of *nodS* in N-methylation and *nodU* in 6-O-carbamoylation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. № 39. P. 22968–22973.
44. John M., Rohrig H., Schmidt J., Wiencke U., Schell J. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase // Proc. Natl. Acad. Sci. 1993. Vol. 90. P. 625–629.
45. Kape R., Parniske M., Brandt S., Werner D. Isoliquiritigenin, a strong *nod* gene and glyceollin resistance-inducing flavonoid from soybean root exudate // Appl. Environ. Microbiol. 1992. Vol. 58, № 5. P. 1705–1710.
46. Kamst E., van der Drift K.M.G.M., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J., Spaink H.P. Mass-spectrometric analysis of chitin oligosaccharides produced by *Rhizobium* NodC protein in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1995. P. 6282–6285.
47. Kapulnik J., Joseph C.M., Phillips D.A. Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa // Plant Physiol. 1987. Vol. 84. P. 1193–1196.
48. Kijne J., Diaz C., Eijdsen R., Booij P., Demel R., van Workum W., Wiffelman C., Spaink H., Lugtenberg B., Pater S. Lectins and Nod factors in *Rhizobium-legume* symbiosis // Proc. 1-st European Nitrogen Fixation Conference Szeged. 1994. P. 106–110.
49. Kosslak R. M., Bookland R., Barkei J., Paaren H. E., Applebaum E. R. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod*-genes by isoflavones isolated from *Glycine max* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 7428–7432.
50. Kosslak R. M., Joshi R. S., Bowen B. A., Paaren H. E., Appelbaum E. R. Strain-specific inhibition of *nod* gene induction in *Bradyrhizobium japonicum* by flavonoid compounds // Appl. Environ. Microbiol. 1990. Vol. 56. P. 1333–1341.
51. Kozik A., Heidstra R., Horvath B., Kulikova O., Tikhonovich I., Ellis T. H. N., Van Kammen A., Lie T.A., Bisseling T. Pea lines carrying *sym1* or *sym2* can be nodulated by *Rhizobium* strains containing *nodX*; *sym1* and *sym2* are allelic // Plant Science. 1995. Vol. 108. P. 41–49.
52. Kurkdjian A. C. Role of the differentiation of root epidermal cells in Nod factor (from *Rhizobium meliloti*) - induced root — air depolarization of *Medicago sativa* // Plant Physiol. 1995. Vol. 107. P. 783–790.
53. Lerouge P., Roche P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J.-C., Denarie J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulfated and acylated glucosamine oligosaccharide // Nature. 1990. Vol. 344. P. 781–784.
54. Lie T. A. Symbiotic specialisation in pea plants: The requirement of specific *Rhizobium* strains for peas from Afghanistan // Ann. Appl. Biol. 1978. Vol. 88. P. 462–465.
55. Lie T. A. Host genes in *Pisum sativum* L. conferring resistance to European *Rhizobium leguminosarum* strains // Plant and Soil. 1984. Vol. 82. P. 415–425.

56. Lopez-Lara I. M., van den Berg J. D. J., Thomas-Oates J. E., Glushka J., Lugtenberg B. J. J., Spaink H. P. Structural identification of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals of *Rhizobium loti* // Mol. Microbiol. 1995. Vol. 15, № 4. P. 627–638.
57. Lopez-Lara I. M., Blok-Tip L., Quinto C., Garcia M. L., Stacey G., Bloemberg G., Lamers G. E. M., Lugtenberg B. J. J., Thomas-Oates J. E., Spaink H. P. NodZ of *Bradyrhizobium* extends the nodulation host range of *Rhizobium* by adding a fucosyl residue to nodulation signals // Mol. Microbiol. 1996. Vol. 21, № 2. P. 397–408.
58. Lugtenberg B. J. J., van Brussel A. A. N., Okker R. J. H. et al. Mechanism of activation of *Rhizobium nodD* gene // Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. St. Paul. 1988. P. 79–83.
59. Lugtenberg B. J. J., de Maagd R., van Brussel A. A. N. et al. Regulatory steps in nodulation by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. New York: London, 1990. P. 215–218.
60. Lynn D. G., Chang M. Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development // Annu. Rev. Plant Physiol. 1990. Vol. 41. P. 497–526.
61. Mercado-Blanco J., Olivares J. A protein involved in stabilization of a large non-symbiotic plasmid of *Rhizobium meliloti* shows homology to eukaryotic cytoskeletal proteins and DNA-binding proteins // Gene. 1994. Vol. 139. P. 133–134.
62. Myeong-Je C., Harper J. E. Effect of inoculation and nitrogen on isoflavonoid concentration in wild - type and nodulation mutant soybean roots // Plant Physiol. 1991. Vol. 95. P. 435–442.
63. Naumkina T. S. Improvement of nitrogen fixation in peas (*Pisum sativum* L.) // Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Dordrecht etc. 1995. P. 714.
64. Ovtysna A. O., Geurts R., Bisseling T., Lugtenberg B. J. J., Tikhonovich I. A., Spaink H. P. Restriction of host range by the *sym2* allele of Afghan peas is non-specific for the type of modification at the reducing terminus of nodulation signals // MPMI. 1998. Vol. 11, № 5. P. 418–422.
65. Peters N. K., Frost J. W., Long S. R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* genes // Science. 1986. Vol. 233. P. 977–980.
66. Peters N. K., Long S. R. Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes // Plant Physiol. 1988. Vol. 88. P. 396–400.
67. Poupot R., Martinez - Romero E., Gautier N., Prome J.-C. Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetyl-fucosylated, N-methylated and carbamoylated nodulation factors // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 6050–6055.
68. Rao A. S. Root flavonoids // The Botanical Review. 1990. Vol. 56. P. 1–84.
69. Rao J. R. and Cooper J. E. Soybean nodulating rhizobia modify *nod* gene inducers daidzein and genistein to yield aromatic products that can influence gene - inducing activity // MPMI. 1995. Vol. 8, № 6. P. 855–862.
70. Relic B., Fellay R., Lewin A., Perret X., Price N. P. J., Rochepeau P., Broughton W. J. *Nod* genes and *Nod* factors of *Rhizobium species* NGR234 // New Horizons in Nitrogen Fixation // Eds Palacios R. et al. Dordrecht; Boston; Lancaster: Kluwer Acad. Publ. 1993. P. 183–189.
71. Relic B., Falmont F., Kopsinska J., Golinowsky W., Prome J.-C., Broughton W. J. Biological activity of *Rhizobium* sp NGR234 *Nod* factors on *Macroptilium atropurpureum* // MPMI. 1994. Vol. 5, № 6. P. 764–774.
72. Ritsema T., Wijffelman A. H. M., Lugtenberg B. J. J., Spaink H. P. *Rhizobium* nodulation protein NodA is a host — specific determinant of the transfer of fatty acids in *Nod* factor biosynthesis // Mol. Gen. Genet. 1996. Vol. 251. P. 44–51.
73. Roche P., Lerouge P., Ponthus C., Prome J.C. Structural determination of bacterial nodulation factors involved in the *Rhizobium meliloti* — alfalfa symbiosis // J. Biol. Chem. 1991a. Vol. 266. P. 10933–10940.
74. Roche P., Debelle F., Mailett F., Lerouge P., Faucher C., Truchet G., Denarie J., Prome J. C. Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipooligosaccharide signals // Cell. 1991b. Vol. 67. P. 1131–1143.
75. Rohrig H., Schmidt J., Wieneke U., Kondorosi E., Barlier I., Schell J., John M. Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is involved in *N*-acylation of the chitooligosaccharide backbone // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 3122–3126.
76. Sadowsky M. J., Olson E. R., Foster V. E., Kossak R. M., Verma D. P. Two host-inducible genes of *Rhizobium fredii* and characterisation of the inducing compound // J. Bacteriol. 1988. Vol. 170. P. 171–178.
77. Sanjuan J., Grob P., Gottfert M., Hennecke H., Stacey G. NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum* // Mol. Plant-Microbe Interact. 1994. Vol. 7. P. 364–369.
78. Sharma S. B., Singer E. R. Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium leguminosarum* in planta revealed by transposon Tn5-*gusA* // Genes and Devel. 1990. Vol. 4. P. 344–356.
79. Schlaman H. R. M., Horvath B., Vijgenboom E., Okker R. J. H., Lugtenberg B.J.J. Suppression of nodulation gene expression in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173. P. 4277–4287.
80. Schlaman H. R. M., Okker R. J. H., Lugtenberg B. J. J. Regulation of nodulation gene expression by NodD in *Rhizobia* // J. Bacteriol. 1992. Vol. 174. P. 5177–5182.



81. Schultze M., Quiclet-Sire B., Kondorosi E., Virelizier H., Glushka J. N., Endre G., Gero S. D., Kondorosi A. *Meliloti* produces a family of sulfated lipo-oligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. Vol. 89. P. 192-196.
82. Spink H. P., Wijnffelman C. A., Pees E., Okker R. J. H., Lugtenberg B. J. J. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* is a dominant of host specificity // *Nature*. 1987. Vol. 328. P. 337-340.
83. Spink H. P., Wijnffelman C. A., Okker R. J. H., Lugtenberg B. J. J. Localization of functional regions of the *Rhizobium* *nodD* product using hybrid *nodD* genes // *Plant Mol. Biol.* 1989. Vol. 12. P. 59-73.
84. Spink H. P., Sheeley D. M., van Brussel A. A. A., Glushka J., Yoric W. C., Tak T., Kennedy E. P., Remington S., Lugtenberg B. J. J. A novel, highly unsaturated, fatty acid moiety of lipooligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium leguminosarum* // *Nature*. 1991. Vol. 354. P. 125-130.
85. Spink H. P., Bloemberg G. V., Van Brussel A. A. N., Lugtenberg B. J. J., van der Drift K. M. G. M., Haverkamp J., Thomas-Oates J. Host specificity of *Rhizobium leguminosarum* is determined by the hydrophobicity of highly unsaturated fatty acyl moieties of the nodulation factors // *MPMI*. 1995a. Vol. 8. P. 155-164.
86. Spink H. P., Wijnffelman C. A., Lugtenberg B. J. J. *Rhizobium* NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides // *J. Bacteriol.* 1995b. Vol. 177. P. 6276-6281.
87. Spink H. P. Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides // *Crit. Rev. Plant Sci.* 1996. Vol. 15. P. 559-582.
88. Stacey G., Luka S., Sanjuan J., Banfalvi Z., Nieuwkoop A. J., Yoon Cjun J., Forsberg L. S., Carlson R. *NodZ*, a unique host — specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum* // *J. Bacteriol.* 1994. Vol. 176. P. 620-633.
89. Staehelin C., Schultze M., Kondorosi E., Kondorosi A. Lipo-chitooligosaccharide Nodulation Signals from *Micorhizium meliloti* Induce Their Rapid Degradation by the Host Plant Alfalfa // *Plant Physiol.* 1995. Vol. 108. P. 1607-1614.
90. Truchet G., Roche P., Lerouge P., Vasse J., Camut S., de Billy F., Prome J.-C., Denarie J. Sulphated lipooligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa // *Nature*. 1991. Vol. 351. P. 670-673.
91. Winarno R., Lie T. A. Competition between *Rhizobium* strains in nodule formation: interaction between nodulating and non-nodulating strains // *Plant and Soil*. 1979. Vol. 51. P. 135-142.
92. Zaat S. A. J., Schripsema J., Wijnffelman C. A. N., van Brussel A. A. N., Lugtenberg B. J. J. Analysis of the inducers of *Rhizobium nodA* promoter from *Vicia sativa* root exudate and their activity with different *nodD* genes // *Proefchrift* "Molecular signals in the early *Rhizobium* — legume interaction". "All in" by Katwijk, the Netherlands. 1989. 127 p.
93. Zaat S. A. J., Wijnffelman C. A., Mulders H. M., van Brussel A. A. N., Lugtenberg B. J. J. Root exudates of various host plant of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of *Rhizobium* nodulation genes // *Plant Physiol.* 1988. Vol. 86. P. 1298-1303.